

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07322

研究課題名(和文)蚊媒介性フラビウイルスRNA複製複合体の構造生物学

研究課題名(英文)Structural biology of the flaviviral replication complex.

研究代表者

清水 英明(Shimizu, Hideaki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10360562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCryoEMによるデングウイルス複製複合体の構造解析によって、5.1Åのストローム分解能のクライオ電顕像からNS3 helicase、NS5 MTase、NS5 RdRpの各ドメインおよびdsRNAをそれぞれアサインすることに成功した。NS3 helicaseドメインがNS5のMTase、RdRpの両ドメインに相互作用するように位置しており、dsRNAはNS5 RdRpの活性中心からNS3 helicase、NS5 MTaseの両ドメイン間にかけて位置していた。また、デングウイルスNS5について、阻害剤ハイスループットスクリーニング、X線結晶構造解析について誌上発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NS5は多種類のタンパク質と会合して巨大かつ複雑な複製複合体を形成することでウイルスRNA複製に必要な機能を発揮していると考えられる。本研究はその分子機構や作動原理を構造生物学的に解明しようとするものであり、その学術的意義は高い。

NS5の構造情報は抗ウイルス薬開発に極めて有用である。また、複製複合体におけるRNAや他のタンパク質との相互作用に関する情報は新たな創薬標的や治療戦略の創出につながる可能性がある。フラビウイルス科にはウエストナイルウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、日本脳炎ウイルスなどが属しており、これらの昆虫媒介性ウイルスに対する治療戦略も提示しうる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：To perform the viral genome replication, the Flavivirus assembles a replication complex with the NS proteins. NS3 and NS5 are major components of the replication complex. NS3 is a multifunctional and the second largest viral protein with a molecular weight of approximately 70 kDa, and requires the hydrophilic loop of NS2B as a cofactor to produce mature proteins. NS5 is the largest NS protein with a molecular weight of approximately 104 kDa. Furthermore, NS3 and NS5 have been suggested to directly interact with each other in the RNA genome replication complex to efficiently exhibit their activities during the RNA synthesis and capping. However, to date, the structural information of the NS3-NS5 complex suitable for the mechanisms of the RNA synthesis and capping have remained elusive. In this study, we have determined the cryo-EM structure of the flaviviral replication complex at 5.1Å. We also reported the HTS and crystallographic study for the DENV NS5 rdp.

研究分野：構造生物学

キーワード：デング CryoEM 複製複合体 X線結晶構造解析 フラグメント RNA HTS ポリメラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、蚊を媒介とするウイルス感染症の世界的な流行がみられ、国際社会の大きな脅威となっている。2014年夏にはデングウイルス感染症(デング熱)の国内流行が68年ぶりに確認された。重篤な病態を呈するデング出血熱、デングショック症候群の恐れから代々木公園が閉鎖されるなど異例の事態となった。これらウイルスに対する有効なワクチンや抗ウイルス薬は未だ確立しておらず、治療は対処療法が主体である。

デングウイルスが属するフラビウイルスはプラス鎖 RNA をゲノムとするエンベロープウイルスで構成され、そのゲノム上には3種の構造タンパクと7種の実質タンパク(NS1/NS2A/NS2B/NS3/NS4A/NS4B/NS5)がコードされている。膜タンパク質であるNS2A、NS2B、NS4A、NS4Bは小胞体の膜上で集合体を形成し、プロテアーゼドメインとRNAヘリカーゼドメインを有するNS3とRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)ドメインとメチルトランスフェラーゼ(MTase)ドメインを有するNS5との複合体がNS2Bを介してこの集合体と会合し、巨大な複製複合体(replication complex)を形成する。そして膜上に形成された小胞体構造体内においてRNA複製を担う。その際、複製複合体のコアとなるNS5-NS3-NS2Bに対してRNA特有の二次構造が絡み合うように結合することによって、巧みなRNA複製が達成されると考えられる。現時点でフラビウイルス複製複合体の構造解析の報告はなく、フラビウイルスのRNA複製の分子メカニズムおよび構造基盤は未解明のままである。その背景として、複合体構成成分としてプロテアーゼ活性を有するNS3や膜結合性タンパク質が含まれるため、均一で安定な複製複合体の調製が難しいことが挙げられる。申請者はフラビウイルスと類似するアルファウイルス由来の複製複合体(約300kDa)の再構成に成功している。この手法はフラビウイルス由来複製複合体の調製においても有効であると考えている。

ウイルスRNAポリメラーゼ阻害剤は薬剤として極めて高い実用性を備えており、ウイルス感染症治療戦略の主流となりつつある。近年注目されているエボラ出血熱治療薬候補のアビガン、あるいは新規C型肝炎治療薬のソバルディ(ソホスビル)はその例である。フラビウイルスNS5についても、その構造基盤は薬剤設計において幅広い活用が見込まれる。

2. 研究の目的

複製複合体のNS5-NS3-NS2Bに対してRNAが複雑に結合することによって正確なRNA複製が達成される。そこでNS5-NS3-NS2Bに焦点を当て、デングウイルスNS5-NS3-NS2Bの再構成、及びその構造解析によってウイルスRNA複製の構造基盤を解明する。さらにRNA結合型、及びデングウイルス複製複合体についても同様に構造解析を試みる。

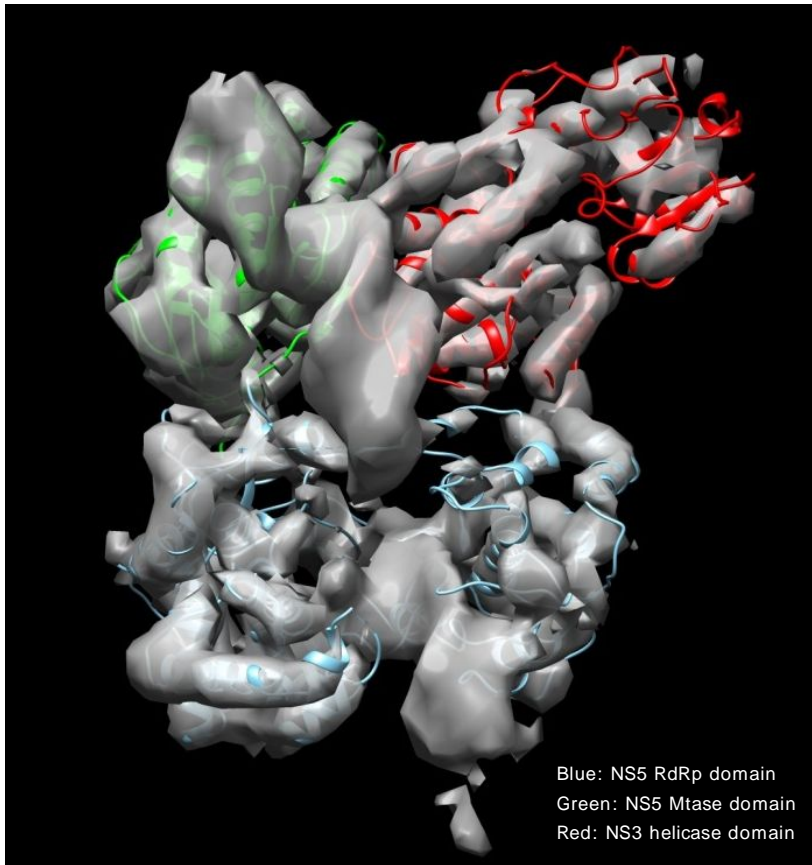
3. 研究の方法

フラビウイルスの7種の実質タンパクはNS3のプロテアーゼ活性によって1本のポリタンパクからそれぞれ分離する。申請者が行ったアルファウイルス複製複合体(フラビウイルスと同様にプロテアーゼによって分離)の再構成実験の結果から、プロセッシングと複製複合体安定性との関連性を示す結果が得られている。さらにNS2Bの膜結合領域を削除することで、NS5-NS3-NS2B複合体の性質向上が期待される。これら知見をもとにコアとなるNS5、NS3、NS2Bの各タンパク質の発現領域を慎重に選定した。さらに各安定領域を組み合わせたNS5-NS3-NS2Bキメラタンパクによる発現系の構築も行った。

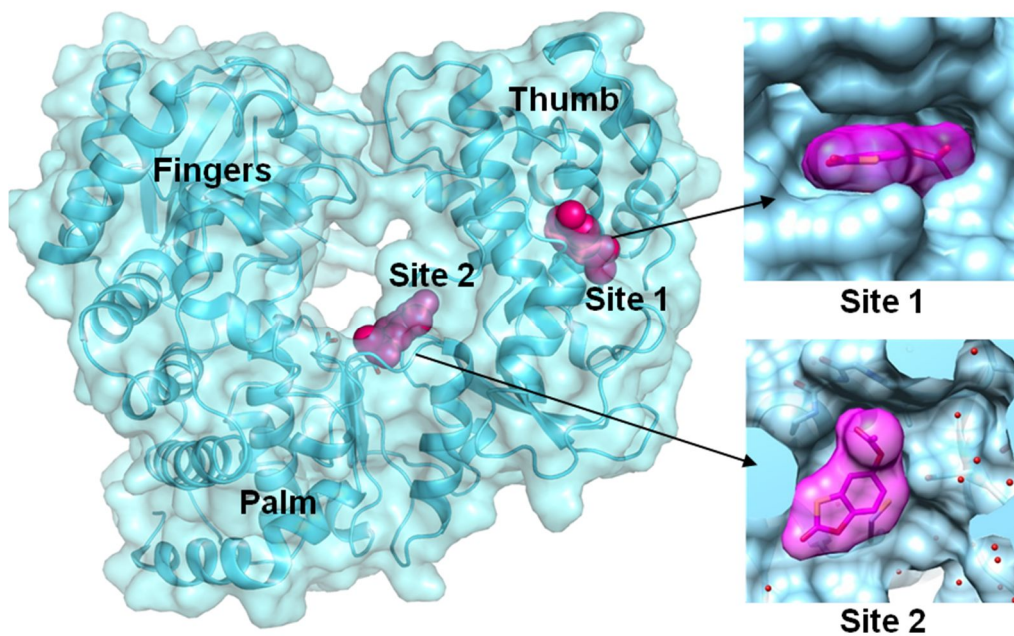
ゲノム複製において、NS3タンパク質はNS5に結合して2重鎖をほどくヘリカーゼとして働くことが知られている。そこでこれらの知見を発展させ、的確なRNAをデザインしてRNA結合型複製複合体の結晶構造解析を試みる。巨大な複合体として調製された場合には、当センターに設置されている電子顕微鏡による高分解能立体構造解析を行う。

4. 研究成果

当センターに設置されているクライオ電子顕微鏡によるデングウイルス複製複合体の構造解析を実施した。巨大なデングウイルス複製複合体(NS5-NS3-NS2B-dsRNA)として調製された画分について解析を実施し、5.1オングストローム分解能のクライオ電顕像を得ることに成功し、NS3 helicase、NS5 MTase、NS5 RdRpの各ドメインおよびdsRNAをそれぞれアサインすることができた。NS3 helicaseドメインがNS5のMTase、RdRpの両ドメインに相互作用するように位置しており、dsRNAはNS5 RdRpの活性中心からNS3 helicase、NS5 MTaseの両ドメイン間かけて位置していた。



また、デングウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ NS5 について、フラグメントライブラリーを用いた阻害剤ハイスループットスクリーニングを実施し、フラグメント複合体の X 線結晶構造解析を決定した。これらの結果について誌上発表(H. Shimizu et al. Discovery of a small molecule inhibitor targeting dengue virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase. PLoS Neglected Tropical Diseases. Vol. 13 Issue 11, 2019)を行った。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Hideaki, Saito Akatsuki, Mikuni Junko, Nakayama Emi E., Koyama Hiroo, Honma Teruki, Shirouzu Mikako, Sekine Shun-ichi, Shioda Tatsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Discovery of a small molecule inhibitor targeting dengue virus NS5 RNA-dependent RNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Neglected Tropical Diseases	6. 最初と最後の頁 e0007894
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----